

ÄNDERUNG DER SAUERSTOFFAFFINITÄT
EINIGER MIKROSOMALER HYDROXYLASEN
DURCH DIE BEHANDLUNG VON KANINCHEN
MIT PHENOBARBITAL

SIGRID MATHES

1991



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Vorstand: Professor Dr.med. Manfred Kiese

ÄNDERUNG DER SAUERSTOFFAFFINITÄT EINIGER MIKROSOMALER
HYDROXYLASEN DURCH DIE BEHANDLUNG VON KANINCHEN MIT
PHENOBARBITAL

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sigrid Mathes

aus

Dresden

Jahr

1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Professor Dr.med. Gerhard Lange

Mitberichterstatter: Professor Dr.med. Manfred Kiese

Dekan: Professor Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.3.1971



ÄNDERUNG DER SAUERSTOFFAFFINITÄT EINIGER MIKROSOMALER HYDROXYLASEN DURCH DIE BEHANDLUNG VON KANINCHEN MIT PHENOBARBITAL

Phenobarbital (Luminal^R) gehört zu den sogenannten Enzym-induktoren. Behandlung von Menschen und Tieren mit derartigen Stoffen, zu denen außer einigen Arzneimitteln auch bestimmte Insektizide, Carcinogene, und Hormone zu rechnen sind, erhöht die Aktivität des Arzneimittel-umbauenden Enzymsystems im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen. Sie führt damit zu einer beschleunigten Biotransformation verschiedener Arzneimittel und körpereigener Steroide in vivo und auch in vitro, nämlich in der Zellfraktion, welche die Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulums enthält, in den sogenannten Mikrosomen (Übersicht bei CONNEY).

Phenobarbital induziert eine Proliferation des "glatten" endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen (REMMER und MERKER 1963; FOUTS und ROGERS), bewirkt eine Zunahme des Lebergewichts, steigert die Synthese an mikrosomalem Protein und Lipoid, führt zu einer Vermehrung an mikrosomalem Cytochrom P-450 und stimuliert den mikrosomalen Arzneimittel- und Steroid-Umbau (Übersicht bei CONNEY).

Die Vergrößerung der Aktivität des mikrosomalen Enzymsystems ist wahrscheinlich - zumindest zu einem Teil - durch die Zunahme des Gehalts der Mikrosomen an Protein und Cytochrom P-450 bedingt. Ob sich noch weitere Faktoren ändern, und welchen Einfluß diese Änderungen auf die Enzymaktivität haben, ist noch weitgehend unbekannt.

Da unter der Einwirkung von Enzyminduktoren einzelne Enzymaktivitäten verschieden stark zunehmen, ergibt sich die Frage, ob im endoplasmatischen Retikulum verschiedene Enzyme vorhanden sind, die während der Induktion verschieden stark zunehmen, oder ob sich durch die Wirkung der Induktoren die Zugänglichkeit oder die Reaktivität von Reaktionspartnern des mikrosomalen Enzymsystems ändern.

Zur weiteren Untersuchung dieser Frage wurde in den Experimenten dieser Arbeit gemessen, wie sich die Abhängigkeit bestimmter mikrosomaler Hydroxylierungsreaktionen vom Sauerstoffpartialdruck durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital ändert.

Parallel zu den Versuchen dieser Arbeit untersuchte G. MOR die Abhängigkeit derselben mikrosomalen Hydroxylierungen vom Kohlenmonoxidpartialdruck und wie sich diese Abhängigkeit durch die Behandlung der Tiere mit Phenobarbital ändert.

F. KRÜBER untersuchte die Änderung der Affinität des reduzierten und nicht reduzierten Cytochrom P-450 für Äthylisocyanid durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigten, daß sich die Abhängigkeit einiger mikrosomaler Hydroxylierungen vom Sauerstoffpartialdruck durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital änderte:

In Ansätzen mit Mikrosomen behandelter Tiere nahmen die p-Hydroxylierungen von Anilin und N-Äthylanilin, die N-Hydroxylierung von Anilin und die Dealkylierung von N-Äthylanilin bei Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks stärker ab als in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere. Die Abhängigkeit der N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin vom Sauerstoffpartialdruck wurde durch die Behandlung mit Phenobarbital nicht verändert.

METHODEN:

1. Behandlung der Tiere

Die Versuche wurden mit Kaninchen in einem mittleren Gewicht von ca. 1700 g durchgeführt. Verwendet wurden weibliche und männliche Tiere einer Mischrasse, die unter konventionellen Haltungsbedingungen mit einer Standarddiät (Altromin K¹⁾) und Leitungswasser versorgt wurden. Diese

¹⁾ Hersteller: ALTROGGE Spezialfutterwerk, Lage (Lippe)

Tiere erhielten innerhalb von einundzwanzig Tagen täglich morgens eine Injektion von 40 mg Phenobarbital-Na in 4 ml isotoner NaCl-Lösung / kg Körpergewicht s.c.. Mit HCl wurde die Injektionslösung auf einen p_H -Wert von ca. 7,4 gebracht; ausgefallenes Phenobarbital wurde durch Erwärmen kurz vor der Injektion wieder gelöst.

Die Kontrolltiere bekamen täglich 4 ml isotoner NaCl-Lösung / kg Körpergewicht s.c.. Die Tötung der Tiere und Isolierung der Mikrosomen aus der Leber erfolgte 24 h nach der letzten Injektion.

2. Isolierung der Mikrosomen aus Kaninchenlebern

Die Tötung der Kaninchen erfolgte durch Nackenschlag und Ausbluten nach Durchtrennung der Carotiden. Sofort nach dem Entbluten wurde die Leber entnommen und mit Eis gekühlt. 25-50 g Leber wurden von Bindegewebe und größeren Gefäßen freipräpariert, mit einer Schere in Stücke geschnitten und durch ein Sieb mit 1 mm weiten Löchern gepreßt (v. JAGOW et al.).

Der Preßsaft wurde mit 2 Volumina eiskaltem 0,1 M Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 verdünnt und zur Entfernung gröberer Partikel 20 min bei +3°Celsius mit 9000 x g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Mikrosomen in der Ultrazentrifuge Spinco Modell L 2 - 65 als Niederschlag nach 60 min Zentrifugieren bei 78000 x g erhalten. Dieser Niederschlag wurde zur Entfernung von Enzymen der löslichen Zellfraktion zweimal mit der dem Überstand entsprechenden Menge 0,1 M Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 gewaschen. Der letzte Niederschlag wurde in 0,1 M Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 suspendiert (aufgefüllt auf 3/5 des Preßsaftvolumens) und bei +3 Celsius aufbewahrt.

Diese Mikrosomenpräparate enthielten - gemessen an der Enzymaktivität - ein Drittel der durch dreifaches Rehomogenisieren des 9000 x g-Niederschlags insgesamt extrahierbaren

Mikrosomen. Dieser Anteil war bei den unbehandelten und den mit Phenobarbital behandelten Tieren gleich (LANGE 1967).

3. Herstellung von Gasgemischen aus Sauerstoff und Stickstoff

Die Gasgemische wurden durch Mischung von Luft oder Sauerstoff mit Stickstoff in Stahlflaschen hergestellt. Vor der Analyse wurden die Gasflaschen zur besseren Mischung der Gase gerollt. Die Konzentration der Gase wurde gaschromatographisch bestimmt (Gaschromatograph Beckman GC 2; Größe der Trennsäule: 1800 x 5,35 mm; Füllung der Säule: Molekularsieb, Partikelgröße 5 Å; Temperatur: 40°Celsius; Trägergas: Helium; Strömungsgeschwindigkeit: 85,25 mm³/min; Druck am Säulenanfang; 2 atm; Heizung der Glühfäden der Wärmeleitfähigkeitszelle: 200 mA). Die Auswertung der Gaschromatogramme erfolgte planimetrisch. Dabei wurde der Unterschied der spezifischen Wärmeleitfähigkeit von Sauerstoff und Stickstoff berücksichtigt (Berechnung der Korrekturfaktoren für $O_2=1,024$ und für $N_2=0,815$ nach KAISER). Bei der Berechnung der Partialdrucke der Gase im Reaktionsgefäß wurde ferner die Größe des mittleren Luftdruckes an den einzelnen Versuchstagen und der Wasserdampfdruck bei 37°Celsius berücksichtigt. Die Messung des Luftdruckes erfolgte in 535 m Höhe des Barometers über Normal-Null (entsprechend der Höhe von München).

4. Messung der Hydroxylierung von Anilin und N-Äthylanilin durch isolierte Lebermikrosomen

Die Messungen erfolgten innerhalb einer Woche nach Isolierung der Mikrosomen. Die Ansätze zur Aktivitätsmessung enthielten bei Verwendung von N-Äthylanilin als Substrat: Mikrosomen von unbehandelten Tieren aus 0,11 g Leber / ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 (entsprechend einem mittleren Proteingehalt von $1,5 \pm 0,06$ mg Protein / ml). Die Ansätze mit Mikrosomen von mit Phenobarbital-behandelten Tieren wurden auf denselben Proteingehalt wie die Ansätze mit Mikrosomen unbehandelter Tiere eingestellt.

Bei Verwendung von Anilin als Substrat enthielten die An-

sätze: Mikrosomen unbehandelter Tiere aus 0,33 g Leber / ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4 (entsprechend einem mittleren Proteingehalt von $4,5 \pm 0,18$ mg Protein / ml). Auch bei Ansätzen mit Anilin als Substrat wurden die Mikrosomen der behandelten Tiere auf denselben Proteingehalt wie die Ansätze mit Mikrosomen unbehandelter Tiere eingestellt.

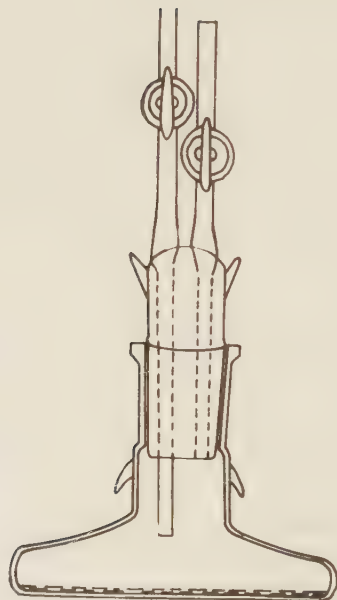
Die Ansätze wurden vervollständigt durch: 0,24 μ Mole/ml NADP, 5 μ Mole/ml Glucose-6-Phosphat, 12 μ Mole/ml Nicotinsäureamid, 6 μ Mole/ml Magnesiumchlorid, 20 BÜCHEREINHEITEN / ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 1 μ Mol/ml N-Äthylanilin oder 1 μ Mol/ml Anilin als Substrate.

Die Enzymansätze hatten ein Gesamtvolumen von 10 ml. Sie befanden sich in speziellen Reaktionsgefäßen, wie sie von HLA-VICA und KIESE benutzt wurden (Abb.1). Die Höhe der Flüssigkeitsschicht betrug 1,25 mm bei 10 ml Ansatzvolumen. Die Ansätze wurden zunächst ohne Substrat in einem Wasserbad von 37° Celsius unter Schütteln (Frequenz 80/min) vorinkubiert und mit Luft bzw. Gemischen aus Sauerstoff und Stickstoff, die einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck als Luft hatten, äquilibriert (Durchströmungsgeschwindigkeit 1,5 l/min/ Reaktionsgefäß; Dauer der Durchströmung 15 min). Die Gase wurden vor der Durchströmung der Reaktionsgefäße zur Sättigung mit Wasserdampf durch Waschflaschen bei 37° Celsius geleitet. Nach der Äquilibrierung wurden die Reaktionen durch Zugabe der Substrate (Einführen eines PVC-Schlauches durch den Gasauslaß) gestartet, unmittelbar danach wurde das offene Gefäßsystem durch Verschluss aller Hähne in ein geschlossenes System verwandelt.

Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen gestoppt: Aliquote Teile der Ansätze wurden in Reagenzgläser pipettiert, die eisgekühlte Lösungsmittel zur Extraktion der Metabolite enthielten.

Folgende Reaktionen wurden gemessen:

- a. Die Dealkylierung von N-Äthylanilin zu Anilin: Bestimmung des gebildeten Anilins nach BRODIE und AXELROD,
- b. die p-Hydroxylierung von N-Äthylanilin durch Bestimmung des gebildeten N-Äthyl-p-Aminophenols nach BRODIE u. AXELROD

ABBILDUNG 1

Reaktionsgefäß für die Messung der Aktivität von Enzym-
ansätzen bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken
 (nach HLAVICA und KIESE)

Höhe der Flüssigkeitsschicht: 1,25 mm bei 10ml Ansatz-
 volumen

Bodenfläche: 20 cm²

Gasraum: 90 ml

unter Berücksichtigung der gegenüber p-Aminophenol geringeren Geschwindigkeit der Indolephenol-Reaktion (KALFF-MEYER u. KIESE 1964a),

- c. die N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin durch Bestimmung des gebildeten Phenylhydroxylamins nach HERR u. KIESE,
- d. die p-Hydroxylierung von Anilin durch Bestimmung des gebildeten p-Aminophenols nach BRODIE u. AXELROD,
- e. die N-Hydroxylierung von Anilin durch Bestimmung des gebildeten Phenylhydroxylamins nach HERR u. KIESE.

Der Proteingehalt der Mikrosomen wurde in Suspensionen gemessen, die Mikrosomen aus 0,22 g Leber / ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 enthielten (Bestimmung nach GORNALL, BARDAWILL u. DAVID).

ERGEBNISSE:

Die Abhängigkeit der p- und N-Hydroxylierung von Anilin vom Sauerstoffpartialdruck in Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen unbehandelter bzw. mit Phenobarbital behandelter Kaninchen zeigt Abb. 2. Auf der Abszisse ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) aufgezeichnet, auf der Ordinate das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit beim pO_2 der Abszisse zur Reaktionsgeschwindigkeit unter Luft. Der Proteingehalt war in den Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelter Kaninchen gleich groß.

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß die Geschwindigkeiten beider Hydroxylierungsreaktionen mit der Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks (unter den pO_2 der Luft) abnahmen. Die N-Hydroxylierung wurde stärker vermindert als die p-Hydroxylierung. Bei beiden Hydroxylierungsreaktionen war die Abnahme in Ansätzen mit Mikrosomen behandelter Tiere größer als in den Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere.

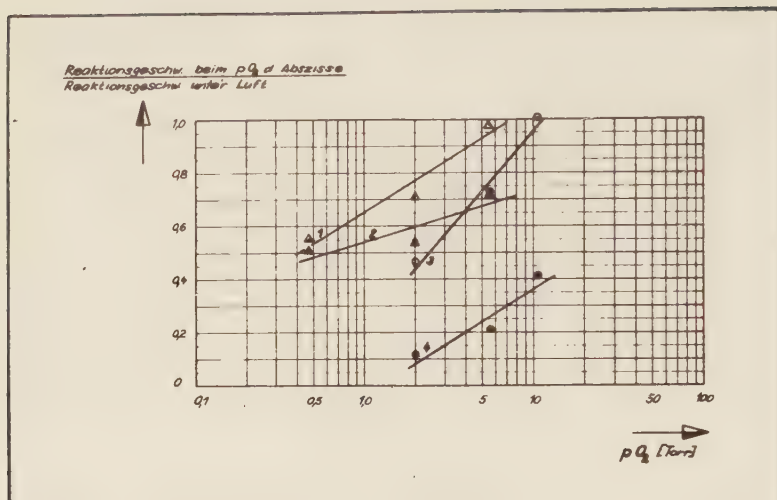


ABBILDUNG 2

Abhängigkeit der p- und der N-Hydroxylierung von Anilin vom Sauerstoffpartialdruck in Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelter Kaninchen

Die Werte, die mit Ansätzen von Mikrosomen unbehandelter Tiere gewonnen wurden, sind durch offene Symbole dargestellt, die Werte von Ansätzen mit Mikrosomen behandelter Tiere durch ausgefüllte Symbole: p-Hydroxylierung von Anilin Δ (Kurve 1), Δ (Kurve 2); N-Hydroxylierung von Anilin $\circ$ (Kurve 3), $\bullet$ (Kurve 4).

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus im Mittel 5, mindestens jedoch 3 Versuchen. Der Proteingehalt der Ansätze betrug sowohl bei den Versuchen mit Mikrosomen unbehandelter als auch bei denjenigen mit Mikrosomen behandelter Tiere: $4,5 \pm 0,18$ mg/ml. Als Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Metabolitbildung / ml Ansatz / 10 min gemessen. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung dieser Versuche sind in Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1

Abhängigkeit der p- und der N-Hydroxylierung von Anilin vom Sauerstoffpartialdruck in Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelte Kaninchen

Reaktion	O ₂ -Partial- druck in Torr	RG b. pO ₂ d. 2.Spalte		p
		RG unter Luft		
		U	Ph	
p-Hydroxy- lierung	0,47	0,56 ±0,053	0,51 ±0,047	< 0,25
	2,0	0,71 ±0,047	0,54 ±0,011	< 0,01
	5,4	0,98 ±0,067	0,72 ±0,053	< 0,025
	2,0	0,47 ±0,065	0,12 ±0,020	< 0,0025
	5,4	0,73 ±0,055	0,21 ±0,048	< 0,0005
	10,5	1,01 ±0,052	0,42 ±0,106	< 0,0005
N-Hydroxy- lierung				

Die Zahlen sind Mittelwerte [±]mittlerer Fehler des Mittelwerts aus im Mittel 5, mindestens jedoch 3 Versuchen.

RG= Reaktionsgeschwindigkeit

U= isolierte Lebermikrosomen unbehandelter Kaninchen

Ph= isolierte Lebermikrosomen Phenobarbital-behandelte Kaninchen

p= Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied zwischen den U- und den Ph-Werten

Die Abb. 3 zeigt die Abhängigkeit der Dealkylierung, der p-Hydroxylierung und der N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin vom Sauerstoffpartialdruck in Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen unbehandelter bzw. mit Phenobarbital behandelter Kaninchen. Auf der Abszisse ist wiederum der Sauerstoffpartialdruck aufgezeichnet, auf der Ordinate das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit beim pO_2 der Abszisse zur Reaktionsgeschwindigkeit unter Luft.

Die Geschwindigkeiten der p-Hydroxylierung und der Dealkylierung nahmen in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere bei Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks etwa gleich stark ab. Die Verminderung der N-Hydroxylierung war unter denselben Bedingungen wesentlich größer. In Ansätzen mit Mikrosomen behandelter Tiere nahmen die p-Hydroxylierung und die Dealkylierung stärker ab als in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere. Die Verminderung der N-Hydroxylierung war dagegen in beiden Gruppen von Ansätzen etwa gleich groß.

Aus den Tabellen 1 und 2 ist zu ersehen, daß die Mittelwerte der Quotienten aus Reaktionsgeschwindigkeit bei erniedrigtem pO_2 und Reaktionsgeschwindigkeit unter Luft bei den verschiedenen Sauerstoffpartialdrucken mit einem mittleren Fehler von weniger als 10% bestimmt wurden.

Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Spalten U und Ph (Ansätze mit Mikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelter Tiere) sind statistisch gesichert bei den folgenden Reaktionen: p-Hydroxylierung von Anilin (bei 2 bzw. 5,4 Torr), N-Hydroxylierung von Anilin, p-Hydroxylierung von N-Äthylanilin, Dealkylierung von N-Äthylanilin. Bei der N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin ergab sich kein Unterschied zwischen den Ansätzen unbehandelter bzw. behandelter Tiere.

In der Tabelle 3 sind die Sauerstoffkonzentrationen angegeben, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeiten halb so

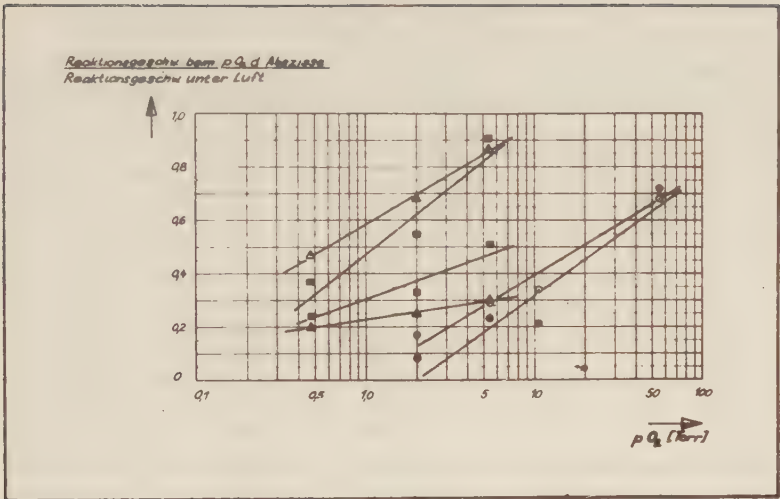


ABBILDUNG 3

Abhängigkeit der p-Hydroxylierung, der N-Hydroxylierung und der Dealkylierung von N-Äthylanilin vom Sauerstoffpartialdruck in Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelter Kaninchen

Die Werte, die mit Ansätzen von Mikrosomen unbehandelter Tiere gewonnen wurden, sind durch offene Symbole dargestellt, die Werte von Ansätzen mit Mikrosomen behandelter Tiere durch ausgefüllte Symbole: p-Hydroxylierung von N-Äthylanilin $\triangle$ (Kurve 1), $\blacktriangle$ (Kurve 2); N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin $\circ$ (Kurve 3), $\bullet$ (Kurve 4); Dealkylierung von N-Äthylanilin $\square$ (Kurve 5), $\blacksquare$ (Kurve 6).

Mit Ausnahme der N-Hydroxylierung bei 2 Torr O_2 , die nur in einem Versuch gemessen wurde, sind die angegebenen Werte Mittelwerte aus im Mittel 5, mindestens jedoch 3 Versuchen. Der Proteingehalt der Ansätze betrug sowohl bei den Versuchen mit Mikrosomen unbehandelter als auch bei denjenigen mit Mikrosomen behandelter Tiere $1,5 \pm 0,06$ mg/ml. Als Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Metabolitbildung / ml Ansatz / 10 min gemessen. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung dieser Versuche sind in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2

Abhängigkeit der p-Hydroxylierung, der N-Hydroxylierung und der Dealkylierung von N-Äthylanilin vom Sauerstoffpartialdruck in Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelter Kaninchen

Reaktion	O ₂ -Partial- druck in Torr	RG b. pO ₂ d. 2.Spalte		p
		RG unter Luft		
		U	Ph	
p-Hydroxy- lierung	0,47	0,47 ±0,041	0,20 ±0,014	0,0005
	2,0	0,68 ±0,067	0,25 ±0,010	0,0025
	5,4	0,87 ±0,066	0,30 ±0,015	0,0005
	0,47	0,37 ±0,043	0,24 ±0,037	0,025
	2,0	0,55 ±0,037	0,33 ±0,029	0,005
	5,4	0,91 ±0,085	0,51 ±0,091	0,01
Dealky- lierung	2,0	0,17 ^{x)}	0,08 ^{x)}	
	5,4	0,29 ±0,055	0,23 ±0,076	0,3
	10,5	0,34 ±0,063	0,21 ±0,037	0,1
	55,0	0,68 ±0,087	0,72 ±0,060	0,4

Die Zahlen sind Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwerts aus im Mittel 5, mindestens jedoch 3 Versuchen, ausser bei den mit ^{x)} bezeichneten Werten (nur ein Versuch).

RG= Reaktionsgeschwindigkeit

U= isolierte Lebermikrosomen unbehandelter Kaninchen

Ph= isolierte Lebermikrosomen Phenobarbital-behandelter Kaninchen

p= Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied zwischen den U- und den Ph-Werten

groß waren wie unter Luft. Diese Konzentrationen waren in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere bei der p-Hydroxylierung von Anilin, der p-Hydroxylierung und der Dealkylierung von N-Äthylanilin am geringsten und etwa gleich groß. Der Wert für die N-Hydroxylierung von Anilin war etwas, der Wert für die N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin wesentlich größer. Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital wurden die Werte mit Ausnahme des Wertes für die N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin größer. Die Zunahme der Werte war bei den einzelnen Reaktionen verschieden groß.

DISKUSSION:

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der p-Hydroxylierung von Anilin, der p-Hydroxylierung und der Dealkylierung von N-Äthylanilin nahmen in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere bei Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks etwa gleich stark ab. Die N-Hydroxylierung der beiden Substrate wurde unter diesen Bedingungen stärker vermindert. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden von KAMPPFFMEYER und KIESE (1964b; vgl. Tabelle 3). Die Sauerstoffkonzentrationen, bei denen die Reaktionen mit halber Maximalgeschwindigkeit abliefen, waren bei den Untersuchungen dieser Arbeit etwas anders als bei KAMPPFFMEYER und KIESE (1964b). Dieser Unterschied könnte bedingt sein durch das verschiedene Alter der Versuchstiere und verschiedene Versuchsbedingungen: Im Gegensatz zu den Untersuchungen von KAMPPFFMEYER und KIESE wurden in dieser Arbeit die Mikrosomensuspensionen nicht durch schnelle Rotation der Reaktionsgefäße zu einem dünnen, sich schnell bewegenden Film ausgebreitet. Die Reaktionsgefäße wurden während der Inkubation verschlossen und nicht mehr mit Gasgemischen bzw. Luft durchströmt. Der Gehalt der Ansätze an mikrosomalem Protein war wesentlich geringer. Er war in dieser Arbeit 1,5 mg / ml bei N-Äthylanilin als Substrat und 4,5 mg / ml bei Anilin als Substrat, dagegen betrug er in den Ansätzen von KAMPPFFMEYER und KIESE (1964b, vgl. auch 1964a) 9,1 mg / ml.

Tab. 3

Sauerstoffkonzentrationen, bei denen die reaktionsgeschwindigkeiten der gemessenen Hydroxylierungen von Anilin und N-Äthylanilin halb so groß waren wie unter Luft

Substrat	Reaktion	Isolierte Lebermikrosomen		
		unbehandelter junger Kaninchen	mit Phenobarbital behandelter junger Kaninchen	unbehandelter erwachsener Kaninchen (KAMPELMAYER u. KIESE 1964b)
Anilin	p-Hydroxylierung	0,6	0,9	0,7
Anilin	N-Hydroxylierung	3,8	26,0	7,0
N-Äthylanilin	p-Hydroxylierung	0,9	30,0	0,7
N-Äthylanilin	N-Hydroxylierung	29,0	39,7	28,0
N-Äthylanilin	Dealkylierung	1,8	11,0	0,7

Die Sauerstoffkonzentrationen sind in 10^{-6} Mol / Liter angegeben.

Als Ursache für die verschiedene Abhängigkeit einiger der gemessenen Reaktionen vom Sauerstoffpartialdruck wurde von KAMPEMEYER und KIESE (1964b) das Vorhandensein verschiedener Enzyme in den Mikrosomen angenommen. Für eine solche Annahme spricht auch die verschiedene Hemmbarkeit und Induzierbarkeit dieser Reaktionen (HLAVICA und KIESE; LANGE 1966 und 1967).

In Ansätzen mit Mikrosomen Phenobarbital-behandelter Tiere war die Abnahme der p-Hydroxylierung von Anilin, der p-Hydroxylierung von N-Äthylanilin, der Dealkylierung von N-Äthylanilin und der N-Hydroxylierung von Anilin bei Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks stärker als in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere. Die Werte der Sauerstoffkonzentrationen, bei denen diese Reaktionen mit halber Maximalgeschwindigkeit abliefen, nahmen verschieden stark zu. Als maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Geschwindigkeit unter Luft angenommen. Die N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin wurde in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelter Tiere bei Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks gleich stark vermindert.

Der Unterschied der Abhängigkeit einiger der gemessenen Hydroxylierungsreaktionen vom Sauerstoffpartialdruck bei Mikrosomen unbehandelter und bei Mikrosomen Phenobarbital-behandelter Tiere war nicht bedingt durch einen wesentlichen Unterschied im Sauerstoffverbrauch der Ansätze mit diesen beiden Arten von Mikrosomen. Der Unterschied im Sauerstoffverbrauch der Ansätze war nur gering; die durch diesen Sauerstoffverbrauch bedingte Änderung der Sauerstoffkonzentration in den Ansätzen betrug in der Versuchszeit weniger als 10% (LANGE unveröffentlichte Versuche).

Der Unterschied der Abhängigkeit einiger der gemessenen Hydroxylierungsreaktionen vom Sauerstoffpartialdruck bei Mikrosomen unbehandelter und bei Mikrosomen Phenobarbital-behan-

delter Tiere könnte aber bedingt sein durch Änderung der Transport- oder Reaktionsbedingungen für die Substrate, Co-faktoren (einschließlich Sauerstoff) oder Reaktionsprodukte.

Die Hydroxylierungsreaktionen, die in den Mikrosomen ablaufen, benötigen molekularen Sauerstoff als Oxydans und reduziertes nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Reductans. Ein mikrosomales Cytochrom, das Cytochrom P-450, aktiviert den Sauerstoff und wahrscheinlich auch das Substrat. Ein Atom des atmosphärischen Sauerstoffs wird in das Substratmolekül eingeführt, das andere zu Wasser bzw. H_2O_2 reduziert. Die Elektronen zur Reduktion dieses Sauerstoffatoms stammen aus dem NADPH und werden durch eine Kette von Enzymen schließlich über das Cytochrom P-450 auf den Sauerstoff übertragen. Alle diese Enzyme sind wahrscheinlich strukturell in das Gefüge der mikrosomalen Lipoprotein-Membranen eingebaut (SILKOWITZ).

Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital ändert die Zusammensetzung dieser Membranen. Insbesondere nimmt der Gehalt an Lipiden stärker zu als der Gehalt an Protein (REMMER u. MERKER 1965, LANGE 1968, LANGE u. STEUBL). Auch die Zusammensetzung der Lipide wird verändert (LANGE u. STEUBL). Durch die Wirkung von Phenobarbital könnte sowohl die Permeabilität als auch die räumliche Anordnung innerhalb der Membranen geändert werden.

Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital ändert aber auch den Gehalt der isolierten Mikrosomen an Cytochrom P-450. Dieses Cytochrom nimmt wesentlich stärker zu als der Gehalt an Protein. Darüber hinaus nehmen die beiden Absorptionsmaxima der Äthylisocyanid-Verbindung des Cytochrom P-450 verschieden stark zu (LANGE 1968). Durch die Induktion könnte also das Cytochrom selbst verändert werden (Konformationsänderungen des Proteinanteils, Bildung eines neuen Häms oder Änderung im Verhältnis zweier schon vorher vorhandener Häme). Für das mögliche Vorhandensein von zwei Hämo-

proteinen bzw. zweier ineinander umwandelbarer Formen eines Hämoproteins sprechen folgende Befunde:

Isolierte Mikrosomen ergeben mit Substraten zwei Typen von Substrat-Bindungsspektren (IMAI und SATO 1966a; SCHEINGMAN, 1966b, c). Mit Äthylisocyanid geben Mikrosomen ein Spektrum mit zwei Absorptionsmaxima, deren relative Anteile von pH abhängt, und die verschiedene Oxydations-Reduktionsverhalten zeigen (IMAI und SATO 1966b,c).

Induktion mit 3-Methylcholanthren bewirkt bei Ratten nur Zunahme des Absorptionsmaximums bei 455 m μ des Äthylisocyanidspektrums isolierter Mikrosomen; außerdem verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Kohlenmonoxid-Verbindung des mikrosomalen Cytochroms von 450 nach 408 m μ (ALVARES et al., SLADEK und MANNERING).

Bei der NADPH-Oxydation durch isolierte Mikrosomen wurden zwei verschiedene K_s -Werte für Sauerstoff gemessen, woraus STAUDINGER und ZUBRZYCKI auf das Vorhandensein zweier terminaler Oxydasen schließen.

REIMER et al. (1968a und b) haben Absolut-Spektren von Mikrosomen gemessen und zwei Typen gefunden, die bei Behandlung von Ratten mit verschiedenen Induktoren verschieden stark zunehmen.

Durch die bei der Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital entstehenden Änderungen in diesem mikrosomalen Elektronentransportsystem könnte sowohl die Bindung von Sauerstoff als auch die Bindung der Substrate beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, daß durch die Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital die Affinität des mikrosomalen Elektronentransportsystems für Sauerstoff geringer wird. G.MOR fand in parallelen Untersuchungen, daß bei einigen der in dieser Arbeit gemessenen Hydroxylierungsreaktionen die Affinität für Kohlenmonoxid durch die Phenobarbitalbehandlung größer wurde. KROBER et al. haben die Affinität für Äthylisocyanid bei Mikrosomen unter aeroben Bedingungen und nach Reduktion mit Dithionit gemessen. Sie fanden, daß die Affinität in reduzierter Form des mikrosomalen Elektronentransportsystems durch die Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital verändert wurde.

Bei der Induktion mit Phenobarbital findet demnach nicht nur eine Zunahme des mikrosomalen Enzymsystems statt, sondern wahrscheinlich ändert sich auch seine Qualität, d.h. es ändern sich Faktoren, welche für den Transport und die Bindung von Substraten, Cofaktoren, Hemmstoffen und Reaktionsprodukten von Bedeutung sind.

ZUSAMMENFASSUNG:

In Ansätzen mit isolierten Lebermikrosomen wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten der p- und der N-Hydroxylierung von Anilin und N-Äthylanilin und der Dealkylierung von N-Äthylanilin unter Luft und unter Gasgemischen mit niedrigerem Sauerstoffpartialdruck als Luft gemessen.

Zwei Gruppen von Mikrosomen wurden untersucht: a) isolierte Lebermikrosomen von unbehandelten Kaninchen, b) isolierte Lebermikrosomen von Kaninchen, die einundzwanzig Tage mit Phenobarbital behandelt waren.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten aller Reaktionen nahmen mit der Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks ab. Die Verminderung war bei den einzelnen Reaktionen verschieden groß. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeiten durch die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks war in Ansätzen mit Mikrosomen behandelte Tiere größer als in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter Tiere. Nur die Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit der N-Hydroxylierung von N-Äthylanilin war in Ansätzen mit Mikrosomen unbehandelter und behandelte Tiere gleich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diejenigen von KAMPFFMEYER und KLESE (1964b) und sprechen dafür, daß die gemessenen NADPH-abhängigen Hydroxylierungen nicht durch ein einziges Enzym katalysiert werden. Die verschiedene Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck bei Mikrosomen unbehandelter und behandelte Tiere zeigt, daß durch die Behandlung der Kaninchen mit Phenobarbital nicht nur die Menge des mikrosomalen Enzymsystems vergrößert wird, sondern daß sich auch Faktoren ändern, die für den Transport oder die Bindung der Reaktionspartner des mikrosomalen Elektronentransportesystems wichtig sind.

ALVARES, A.P., G.SCHILLING, W.LEWIS, and R.KUNTZMAN: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 521 (1967)

BRODIE, B.B., and J.AXELROD: The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl-p-aminophenol, and p-aminophenol (free and total conjugated) in biological fluids and tissues.

J.Pharmacol. 94, 22 (1948)

CONNELLY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.

Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)

FOOTS, J.R., and C.A.ROGERS: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats.

J.Pharmacol. 147, 112 (1965)

GORIALL, A.G., C.J.BARDAWILL, and M.M.DAVID: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.

J.Biol.Chem. 177, 751 (1949)

HERR, F. und M.KIESE: Bestimmung von Nitrosobenzol im Blute. Naunyn Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 351 (1959)

HLAVICA, P. und M.KIESE: N-oxygenation of N-alkyl and N,N-dialkylanilines by rabbit liver microsomes.

Biochem.Pharm. 18, 1501 (1969)

IMAI, Y., and R. SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in microsomal membranes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 620 (1966a)

IMAI, Y. and R. SATO: Evidence for two forms of P-450 hemo-protein in microsomal membranes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 5 (1966b)

IMAI, Y., and R. SATO: Activation and inhibition of microsomal hydroxylation by ethyl isocyanide.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 80 (1966c)

JAGOW, R.v., H. KAMPFMEYER, and M. KIESE: The preparation of microsomes.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 251, 73 (1965)

KAMPFMEYER, H. and M. KIESE: Further factors effecting the hydroxylation of aniline and some of its derivatives by liver microsomes.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 246, 397 (1964a)

KAMPFMEYER, H. and M. KIESE: The hydroxylation of aniline and N-ethylaniline by microsomal enzymes at low oxygen pressures.

Biochem. Z. 339, 454 (1964b)

KAISER, R.: Gaschromatographie in der Gasphase, erster Teil: Gaschromatographie

Bibliographisches Institut Mannheim 1960

KRÖBER, F.: Ablauf der Induktion mikrosomaler Hämoproteine durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.

Inaug. Diss. München

In Vorbereitung

KRÖBER, F., G. LANGE, S. MATHES und G. MOR: Änderung der Affinität isolierter Lebermikrosomen für Anilin, N-Äthylanilin, Sauerstoff, Äthylisocyanid und Kohlenmonoxid durch die Behandlung junger Kaninchen mit Phenobarbital.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 161 (1968)

LANGE, G.: Über einige Eigenschaften der durch Chlorphenotan oder Phenobarbital induzierten Mikrosomenenzyme aus Kaninchenleber.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 255, 35 (1966)

LANGE, G.: Verschiedene Induktion der mikrosomalen N- und p-Hydroxylierung von Anilin und N-Athylanilin bei Kaninchen.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 230 (1966)

LANGE, G.: ~~Hydroxylase-Aktivität~~ und Hämoproteingehalt von Mikrosomen aus Kaninchenlebern.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 221 (1966)

LANGE, G. und CH. STEUBL: Änderung der Zusammensetzung mikrosomaler Lipide durch Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 263, 235 (1969)

MOR, G.: Änderung der Wirkung von Kohlenmonoxid auf einige mikrosomale Hydroxylierungsreaktionen durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.

Inaug. Diss. München 1969

REMMER, H. u. H.J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital.

Klin. Wschr. 41, 276 (1963)

REMMER, H., and H.J. MERKER: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 123, 79 (1965)

REMMER, H., R.W. ESTABROOK, J. SCHENKMAN, and H. GREIM: Reaction of drugs with microsomal liver hydroxylase: its influence on drug action (Symposium).

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 98 (1968a)

- REMPPE, K., G. SCHMID, u. A. HILDEBRANDT: Die spektralen Eigenschaften von Cytochrom P-450 nach Induktion mit Phenobarbital, Benzpyren und Methylcholanthren.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. exp. Path. 260, 189 (1968b)
- SCHENKMAN, J. B., K. REMMER, and R. W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3, 113 (1967)
- SIEKEWITZ, P. H.: Protoplasm: Endoplasmatic reticulum and microsomes and their properties.
Ann. Rev. Physiol. 25, 15 (1963)
- SLADSK, N. E., and G. J. MANNERING: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 668 (1966)
- STAUDINGER, H. J. u. Z. ZUBRZYCKI: Zur Kinetik der mikrosomalen NADPH-Oxydation bei verschiedenen Sauerstoffdrucken.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 340, 191 (1965)

Lebenslauf

Am 6.6.1943 wurde ich, Sigrid Mathes geb. Schaarschmidt als viertes Kind des Dipl.-Ing. Arthur Schaarschmidt und seiner Ehefrau Frieda, geb. Schwabe in Dresden / Sachsen geboren.

Am 28.2.1945 flüchteten wir nach Bad Gandersheim / Niedersachsen, wo wir bis Anfang März 1956 wohnten. Dort besuchte ich von 1950 bis 1954 die Grundschule und ab 1954 das Gymnasium. Am 6.3.56 siedelten wir nach München über. Von März 1956 bis Juli 1963 besuchte ich das Theodolinden-Realgymnasium für Mädchen in München. An dieser Schule legte ich im Juni 1963 meine Reifeprüfung ab.

Vom 1.10.1963 bis 26.2.1964 arbeitete ich in einem Krankenhaus in der Ostschweiz auf den Abteilungen für Kinderheilkunde und Innere Medizin als Hilfsschwester.

Vom Sommersemester 1964 bis zum Sommersemester 1969 studierte ich an der Universität München Medizin. Im Wintersemester 1969/70 machte ich mein Staatsexamen und bestand mit der Gesamtnote "gut".

1967 heiratete ich den Dipl.-Ing. Wolfgang Mathes.

1968 kam unsere Tochter Stephanie Mathes zur Welt.

Seit Mai 1970 arbeite ich als Medizinalassistentin.

